

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. August 2005 (04.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/070953 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 1/22,
14/005

(74) Anwalt: HOCK, Joachim; Müller-Boré & Partner,
Grafinger Strasse 2, 81671 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000810

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Januar 2005 (27.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 004 043.5 27. Januar 2004 (27.01.2004) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): SARTORIUS AG [DE/DE]; Weender Landstrasse 94-108, 37075 Göttingen (DE). APANOVIS BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Am Klopferpitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): DEMMER, Wolfgang [DE/DE]; Obere Lindenbreite 11, 37077 Göttingen (DE). GRABOSCH, Matthias [DE/DE]; Südekumweg 6b, 37120 Bovenden (DE). REIF, Oscar-Werner [DE/DE]; Geibelstrasse 8, 30173 Hannover (DE). NAGEL, Wolfgang [DE/DE]; Ebenböckstrasse 23, 81241 München (DE). DONZEAU, Mariel [DE/DE]; Richelstrasse 28, 80634 München (DE). REICHELT, Peter [DE/DE]; Leonrodstrasse 2, 80634 München (DE).

WO 2005/070953 A1

(54) Title: PURIFICATION OF HIGH-MOLECULAR COMPOUNDS BY MEANS OF AFFINITY MEMBRANE CHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: REINIGUNG VON HOCHMOLEKULAREN VERBINDUNGEN MITTELS AFFINITÄTSMEMBRAN-CHROMATOGRAPHIE

(57) Abstract: The invention relates to a method for purifying and/or isolating high-molecular compounds, such as high-molecular proteins or protein-type compounds, contained in a solution or a suspension, by means of affinity chromatography using membranes containing metal ions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung und/oder Isolierung von in einer Lösung oder Suspension enthaltenen hochmolekularen Verbindungen, wie hochmolekulare Proteine oder proteinartige Verbindungen, mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Metallionen-enthaltender Membranen.

REINIGUNG VON HOCHMOLEKULAREN VERBINDUNGEN MITTELS AFFINITÄTSMEMBRANCHROMATOGRAPHIE

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufreinigung und/oder Isolierung von in einer Lösung oder Suspension enthaltenen hochmolekularen Verbindungen, wie hochmolekulare Proteine oder proteinartige Verbindungen, 10 mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Metallionen-enthaltender Membranen.

Chromatographische Verfahren spielen bei der Aufreinigung und Isolierung von Proteinen oder proteinartigen Verbindungen, insbesondere bei Verwendung als 15 Impfstoff, eine wichtige Rolle. Beispielsweise werden im Stand der Technik affinitäts-chromatographische Verfahren zur Reinigung von rekombinanten Bakteriophagen beschrieben, die jedoch unter anderem nachteiligerweise eine sehr geringe Bindungskapazität des verwendeten Chromatographiematerials aufweisen (vgl. Bass et al., 1990; McCafferty et al., 1991; US 5,750,373; US 20 5,688,666; WO 92/09690).

So wird bei der Herstellung von filamentösen Bakteriophagen, die auf ihrer Oberfläche rekombinante Proteine tragen bzw. exprimieren, wobei solche rekombinanten Proteine z.B. Antigene für den Einsatz als therapeutische Vakzine 25 gegen Krebserkrankungen oder Autoimmunkrankheiten, oder Antigene für den Einsatz von prophylaktischen Vakzinen gegen Infektionskrankheiten, sein können, in den meisten Fällen ein Gemisch aus Bakteriophagen erhalten, die viele, wenige oder keine rekombinanten Proteine tragen, wobei es sich in letztem Fall um Wildtyp-Bakteriophagen handelt. Je nach verwendetem Antigen wird eine 30 unterschiedlich gute Expression des Antigens erhalten. Dies bedeutet, daß der Anteil der Phagen, die Antigene tragen, je nach verwendetem Antigen unterschiedlich hoch sein kann. Im Gegensatz zu anderen viralen Partikeln, die meist selbst das Antigen darstellen, gibt es folglich bei der Herstellung von

- 2 -

rekombinanten Bakteriophagen ein besonderes Problem, nämlich die Abtrennung der Wildtyp-Bakteriophagen von den gewünschten Bakteriophagen, die das rekombinante Protein, beispielsweise ein Antigen, auf der Oberfläche tragen. Bei der Verwendung von rekombinanten Phagenimpfstoffen kommt es unter anderem

5 auf die Dichte des rekombinanten Antigens an, das auf der Oberfläche des Phagen exprimiert wird, denn das eigentliche Ziel der Immunisierung ist eine spezifische Immunantwort gegen das exprimierte rekombinante Antigen zu induzieren. Die Wildtyp-Bakteriophagen können hierbei interferierend wirken, da nicht die Immunantwort gegen den Bakteriophagen das Ziel ist, sondern eine
10 Immunantwort gegen die "fremden" Antigene, die auf dem Phagen exprimiert werden. Durch hohe Verunreinigungen mit Wildtyp-Bakterienphagen wird das Verhältnis zwischen Immunreaktion gegen das Antigen und Immunreaktion gegen den Phagen schlechter. Darum ist es wünschenswert, die Bakteriophagen aufzureinigen, die das gewünschte Antigen auf der Oberfläche aufweisen und die
15 unerwünschten Wildtyp-Bakteriophagen abzutrennen.

Ferner ist es insbesondere bei rekombinanten Impfstoffen wünschenswert, kontaminierende Moleküle jeglicher Art insbesonders Proteine und Endotoxine des für die Herstellung der rekombinanten Impfstoffe verwendeten

20 Wirtsorganismus, beispielsweise *E. coli* oder Säugerzellen, und potentiell kontaminierende Proteine und niedermolekulare Verbindungen, wie Antibiotika, Cytokine etc., aus dem Kulturnährmedium von z.B. Bakterien oder Säugerzellen von den rekombinanten Impfstoffen abzutrennen, um eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen.

25 Eine weitere wichtige Anforderung an das Reinigungsverfahren für gentechnologisch hergestellte Proteine, (Poly)peptide oder rekombinante Bakteriophagen, welche als Impfstoffe verwendet werden können, ist die großtechnische Herstellbarkeit, damit solche Mengen an beispielsweise
30 rekombinanten Bakteriophagen produziert werden können, die zur Anwendung beim Menschen ausreichend sind.

- 3 -

Die strukturellen Eigenschaften von partikulären Substanzen, wie Multimere Proteinkomplexe, Multienzymkomplexe, rekombinante Viren, VLP's und Bakteriophagen, stellen ein Problem für herkömmliche Aufreinigungsmedien auf Partikelbasis dar, wobei sich derartige Substanzen durch solche Medien auf Partikelbasis nicht oder nur sehr schlecht aufreinigen lassen. Am nachfolgenden Beispiel von filamentösen Bakteriophagen wird dies deutlich.

Fd-Phagen weisen eine ungewöhnliche Form (z.B. hat der fd-Phage einen Durchmesser von 6 nm und eine Länge von bis zu 900nm) mit einem Molekulargewicht von etwa 15×10^6 Dalton auf, was spezielle Anforderungen an die Reinigung stellt. In der PCT/EP99/03380 ist ein Verfahren zur Herstellung von Phagenvakzinen gegen Tumoren beschrieben. Diese Vakzine werden bereits mit gutem Erfolg eingesetzt, es wäre jedoch wünschenswert, das darin beschriebene Herstellungsverfahren für den großtechnischen Einsatz weiter zu vereinfachen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, welches eine kostengünstige und schnelle Konzentrierung, Aufreinigung und/oder Isolierung von hochmolekularen Verbindungen, wie hochmolekulare Proteine oder proteinartige Verbindungen, beispielsweise filamentöse, nicht natürlicherweise auf der Oberfläche vorkommende Antigene tragende Bakteriophagen, insbesondere im großtechnischen Maßstab ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch Bereitstellung der in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Insbesondere wird ein Verfahren zur Aufreinigung und/oder Isolierung von in einer Lösung oder Suspension enthaltenen hochmolekularen Verbindungen, wie hochmolekulare Proteine oder hochmolekulare proteinartige Verbindungen, bereitgestellt, umfassend die Schritte:

(a) Aufbringen der Lösung oder Suspension auf eine Metallionen-enthaltende Membran und

- 4 -

(b) affinitätschromatographische Abtrennung der hochmolekularen Verbindungen durch deren Bindung an die Metallionen-enthaltende Membran, wobei die hochmolekularen Verbindungen die Fähigkeit zur Metallchelat-Bildung aufzeigen und vorzugsweise ein Molekulargewicht von 5 größer als 1×10^6 Da, mehr bevorzugt größer als 2×10^6 und besonders bevorzugt größer 5×10^6 Da aufweisen.

Die hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine oder proteinartige Verbindungen, lassen sich aufgrund ihrer Größe und/oder Form über herkömmliches Chromatographiematerial, wie modifizierte Agarose, z. B. Sepharose®, im wesentlichen nicht aufréinigen und/oder isolieren. Beispielsweise können Viren eine icosahedrale, helikale oder komplexe Form aufweisen und behüllt oder unbehüllt sein, wobei Viren beispielsweise eine Größe von etwa 10 nm bis etwa 100 nm aufweisen. In besonderen Fällen sind Viren stäbchenförmig 10 und weisen eine Länge von mehreren hundert Nanometern auf. Beispielsweise hat der Phage M13 eine Länge von etwa 900 nm. Insbesondere können bei einer gelchromatischen Auftrennung bzw. Isolierung die hochmolekularen Verbindungen im wesentlichen nicht in das heteroporöse gequollene Netzwerk der Perlen bzw. „Beads“ (wie beispielsweise Sepharose®), die herkömmlicherweise 15 als stationäre Phase in der Gelchromatographie verwendet werden, eindringen.

Der Begriff "Metallion(en)" unterliegt keiner besonderen Einschränkung, insoweit die verwendeten Metallionen eine spezifische Affinität zu den zu reinigenden und/oder zu isolierenden Proteinen oder proteinartigen Verbindungen aufweisen. 20 Bevorzugte Metallionen sind aus der Gruppe, bestehend aus Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} und Gemischen aus mindestens zwei dieser Metallionen, ausgewählt. Besonders bevorzugt ist das Metallion Cu^{2+} .

Das Matrixmaterial der erfindungsgemäß verwendeten Membran unterliegt keiner 30 besonderen Einschränkung und ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Agarosen, modifizierten Agarosen, modifizierten Dextranen, Polystyrolen, Polyethern, Polyacrylamiden, Polyamiden, z.B. Nylon, Cellulose, modifizierten Cellulosen wie vernetzten Cellulosen, Nitrocellulosen,

- 5 -

Celluloseacetaten, Silikaten und Poly(meth)acrylaten, Polytetrafluorethylen, Polyester, Polyvinylchloriden, Polyvinylidenfluorid, Polypropylen, Polysulfonen und Polyethersulfonen. Die Porengröße der erfindungsgemäß verwendeten Membran liegt vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 12 µm, bevorzugt von 0,45 bis 7 µm, besonders bevorzugt von 3 bis 5 µm.

Der Begriff „hochmolekulare Verbindungen“ umfaßt hochmolekulare Proteine und hochmolekulare proteinartige Verbindungen sowie Biopolymere, Lipide, Mizellen und Liposomen.

10

Der Begriff "proteinartige Verbindung(en)" umfaßt (Poly)peptide und Derivate davon, derivatisierte Proteine, rekombinante Proteine und (Poly)peptide, Di-, Tri-, Tetra-, bis Multimere von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen, (Multi)proteinkomplexe, Zellorganelle, Fusionsproteine, Viren und Teile davon, wie beispielsweise Hüllproteine, rekombinante Viren und Teile davon, rekombinante Bakteriophagen, wie beispielsweise rekombinante filamentöse Bakteriophagen, und Teile davon, die auf ihrer Oberfläche nicht natürlicherweise vorkommende Antigene tragen. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden rekombinante, filamentöse Bakteriophagen als proteinartige Verbindungen aufgereinigt und/oder isoliert.

15

Der Begriff "filamentöser Bakteriophage" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sämtliche Phagen, welche eher helikale als eikosaedrische Symmetrie aufweisen. Der filamentöse Bakteriophage kann ein Klasse I-Phage, wie z.B. fd-, M13-, f1-, If1-, Ike-, ZJ/Z- oder Ff-Phage sein oder ein Klasse II-Phage, wie z. B. Xf-, Pf1- oder Pf3-Phage sein. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die proteinartige Verbindung der filamentösen Bakteriophage M13.

20

25

30

Unter "nicht natürlicherweise vorkommende Antigene" im Zusammenhang mit dieser Erfindung werden Antigene, wie z.B. Proteine, verstanden, die nicht in den Capsiden der Wildtyp-Formen filamentöser Bakteriophagen vorkommen. Es handelt sich hierbei um Antigene, welche rekombinant durch den Phagen

- 6 -

exprimiert und in das Capsid eingebaut werden können, oder welche chemisch beispielsweise an das Capsid gebunden werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen
5 Verfahrens ist das rekombinante exprimierte Protein auf dem Bakteriophagen ein Fusionsprotein mit dem Protein III und/oder dem Protein VIII des Bakteriophagens.

Das Antigen muß ein Fusionsprotein mit einem Phagenprotein sein, wenn es auf
10 dem Phagen rekombinant exprimiert werden soll. Sonst kann es nicht eingebaut werden. Im Falle des Proteins III reicht auch ein Teil dieses Proteins aus, da sich dieses am Kopf des Phagen befindet und nur an einem Ende mit dem Phagen verbunden ist. Beim Protein VIII ist das gesamte Protein notwendig, weil sonst kein Einbau in den Phagen erfolgen kann (p VIII ist relativ klein und bildet die
15 Hülle des Phagen). Der Vorteil des Einbaues des Antigens durch rekombinante Expression als Fusionsprotein ist, daß die Präsentation auf der Phagoberfläche gerichtet bzw. genau definiert ist.

Unter "Aufreinigung von hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine oder
20 proteinartige Verbindungen, beispielsweise rekombinante, filamentöse Bakteriophagen", ist im Sinne dieser Erfindung zu verstehen, daß mindestens 97%, vorzugsweise mindestens 98%, besonders bevorzugt mindestens 99% und am meisten bevorzugt mindestens 99,8% der durch das Verfahren zu reinigenden Proteine oder proteinartigen Verbindungen vorliegen.

25 Unter "Isolierung von hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine oder proteinartige Verbindungen, beispielsweise rekombinante, filamentöse Bakteriophagen" ist in dieser Erfindung zu verstehen, daß alle durch das Verfahren gereinigten hochmolekularen Verbindungen im wesentlichen rein sind.
30 Vorzugsweise enthalten die isolierten hochmolekularen Verbindungen keine kontaminierenden Proteine, wie beispielsweise im Fall von isolierten Bakteriophagen keine kontaminierenden *E. coli* -Proteine, und/oder keine Nährmediumbestandteile mehr.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden rekombinante, Antigen-tragende Bakteriophagen aufgereinigt und/oder isoliert, wobei es überraschenderweise möglich ist, mindestens 1×10^{13} Antigen-

5 tragende Bakteriophagen pro 50 bis 100 cm² Membranfläche aus einem Gemisch, welches sowohl Wildtyp-Bakteriophagen als auch Antigen-tragende Bakteriophagen enthält, aufzureinigen und/oder zu isolieren.

Aufgrund der überraschenderweise hohen Menge an aufgereinigtem Material pro

10 Flächeneinheit der Membran kombiniert mit der hohen Reinheit, welche die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren aufgereinigten und/oder isolierten hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine oder proteinartige Verbindungen, aufweisen, ist es möglich, diese in großtechnischem Maßstab als Impfstoffe herzustellen und einzusetzen. Das trifft insbesondere für die rekombinan-

15 Bakteriophagen zu. Die unerwarteten Vorteile der Erfindung zeichnen sich besonders durch eine im Tierversuch wesentlich höhere Wirksamkeit im Vergleich zu den nicht gereinigten Bakteriophagen aus. Die Erprobung der Wirksamkeit eines Impfstoffes sind dem Fachmann bekannt und somit Stand der Technik.

20 Das Prinzip der Metallionen-Affinitätschromatographie beruht auf der Metallchelat-Bildung bzw. Komplexbildung zwischen Metallionen wie Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ und Co³⁺, und dem zu reinigenden Protein, welches vorzugsweise eine Abfolge von 5 bis 6 Histidinresten ("His-Tag") oder mehrere solcher Einheiten hintereinander, aufweist.

25 Das Metallion kann über einen weiteren Komplexbildner an die Membranmatrix gekoppelt sein. Das Prinzip dahinter ist, dass viele Metalle, wie Kupfer und Zink, und deren Ionen Koordinationskomplexe mit den Aminosäuren Histidin, Cystein und Tryptophan über Elektronendonatorgruppen der Seitenketten der Aminosäuren bilden können. Um diesen Effekt für die Chromatographie nutzen zu können, müssen diese Metallionen auf einer inerten Matrix immobilisiert werden.

30 Dies kann durch Aufbringen einer chelatbildenden Gruppe auf die Matrix erreicht werden. Von besonderer Bedeutung ist zum Gebrauch solcher Gruppen, dass sie auf der Matrix fixiert sind und eine hohe Affinität zur zu reinigenden Substanz aufweisen. Der gebräuchlichste chelatbildende Ligand in dieser Art der

- 8 -

Chromatographie ist Iminodiessigsäure (IDA). Sie bildet ein Chelat (mehrfache Koordinationsstellen) mit Metallen. Die gebräuchlichsten Metalle sind Kupfer und Zink, aber auch andere, wie Kobalt, Nickel, Eisen, Lanthan, Mangan und Calcium sind beschrieben worden. Der His-Tag kann sich im Protein am N-Terminus, am
5 C-Terminus oder auch intern befinden. Das Besondere bei der erfindungsgemäßen Reinigung von rekombinanten Bakteriophagen ist, daß es sich dabei nicht um ein einzelnes Protein handelt, sondern um einen Phagenpartikel, das aus tausenden Proteinen besteht oder um Phagenpartikelfragmente, die aus kleineren Multimeren bestehen und eine sehr
10 ungewöhnliche Form besitzen.

Ein "Tag" im Sinne der Erfindung ist ein Bindungspartner, welcher mit dem zu reinigenden Protein oder proteinartigen Verbindung ein Fusionsprotein bildet, wobei die spezifische Interaktion dann zwischen dem Tag und einem für den Tag
15 spezifischen Metallion stattfindet. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Tag ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus His-Tag, Flag-Tag und Myc-Tag.

Weiterhin sind nativ auftretende Proteinmotive mit Metallchelateigenschaften, wie
20 z.B. sog. Zinkfingermotive von Transkriptionsfaktoren als tags im Sinne der Erfindung zu verstehen, da sie in der Lage sind, eine spezielle Interaktion mit Metallionen auszuführen.

Die Form der erfindungsgemäß verwendeten Metallionen-enthaltenden Membran
25 unterliegt keiner besonderen Einschränkung und sie kann in einem Gehäuse, beispielsweise einem Kunststoffgehäuse oder einer Chromatographiesäule angeordnet sein. Bevorzugt ist eine flächige Ausbildung der Metallionen-enthaltenden Membran, wobei in einer Packung für eine Chromatographie-Säule mehrere Lagen der Metallionen-enthaltenden Membran übereinander angeordnet
30 sein können.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann vor Schritt (a) ein die zu reinigenden und/oder isolierenden hochmolekularen Verbindungen enthaltendes Gemisch

- 9 -

einer Ionenaustauscherchromatographie zur Entfernung von Verunreinigungen unterzogen werden. Vorzugsweise wird die Ionenaustauscherchromatographie unter Verwendung einer Ionenaustauschermembran durchgeführt. Die Ionenaustauschermembran umfaßt vorzugsweise ein Matrixmaterial, ausgewählt
5 aus der Gruppe, bestehend aus Agarosen, modifizierten Agarosen, modifizierten Dextranen, Polystyrolen, Polyethern, Polyacrylamiden, Polyamiden, z.B. Nylon, Cellulose, modifizierten Cellulosen wie vernetzten Cellulosen, Nitrocellulosen, Celluloseacetaten, Silikaten und Poly(meth)acrylaten, Polytetrafluorethylen, Polyester, Polyvinylchloriden, Polyvinylidenfluorid, Polypropylen, Polysulfonen
10 und Polyethersulfonen. Die Ionenaustauschermembran weist vorzugsweise eine Porengröße im Bereich von 0,01 bis 12µm, bevorzugt von 0,45 bis 7µm, besonders bevorzugt von 3 bis 5µm auf. Die funktionellen Gruppen der Ionenaustauschermembran unterliegen keiner besonderen Einschränkung und sie sind beispielsweise entsprechend dem zu reinigenden Protein oder der zu
15 reinigenden proteinartigen Verbindung angepaßt. Bevorzugte Beispiele für funktionelle Gruppen sind DEAE, DEA, CM, QA, TMA, S, SP und Phosphat-Gruppen.

Als Beispiele für Verunreinigungen, die über Ionenaustauschchromatographie, z.
20 B. durch Bindung an die Ionenaustauschmembran, entfernt werden können, sind insbesondere Endotoxine anzuführen, die beispielsweise bei rekombinanter Herstellung von Proteinen oder proteinartigen Verbindungen wie rekombinante filamentöse Bakteriophagen, von dem Wirtsorganismus, z. B. *E. coli*, stammen.

25 Es ist ferner möglich, daß Verfahren so zu optimieren, daß vor der Affinitätsmembranchromatographie und/oder vor der Ionenaustausch(membran)chromatographie möglichst viele Verunreinigungen beispielsweise durch im Stand der Technik bekannte Fällungsschritte oder im Stand der Technik bekannte Filtrationsschritte weiter reduziert werden, um so den
30 Kontaminationsgrad so gering wie möglich zu halten. Dies reduziert die Wahrscheinlichkeit an unerwünschten Nebenwirkungen beim Einsatz als biologisch wirksame Substanz, insbesondere als Impfstoff.

- 10 -

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Gemisch, welches beispielsweise das zu reinigende Protein oder die zu reinigende proteinartige Verbindung, wie rekombinante filamentöse Bakteriophage enthält, vor der

5 Affinitätsmembranchromatographie und/oder der Ionenaustausch(membran)chromatographie einer Filtration unter Verwendung von im Handel erhältlichen Filtrationssysteme, wie das Crossflow-Mikrofiltrationssystems der Fa. Sartorius unterzogen. Dabei wird in einer geeigneten Einspannvorrichtung beispielsweise eine Filterkassette mit einer
10 Hydrosart®-Membran mit einer nominellen Porenweite von 0,45 µm oder 0,2 µm verwendet. Der Betrieb solcher Systeme ist dem Fachmann bekannt. Durch die Filtration können weitere Verunreinigungen, wie der Wirtsorganismen oder Bestandteilen davon, entfernt werden. Das so erhaltene Filtrat kann dann, gegebenenfalls nach geeigneter, herkömmlicher Aufbereitung, für die
15 Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätsmembranchromatographie eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als "batch"-Verfahren oder kontinuierlich durchgeführt werden.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren die Weiterformulierung der aufgereinigten und/oder isolierten hochmolekularen Verbindung, z. B. ein Protein oder eine proteinartige Verbindung, als Impfstoff. Beispielsweise werden Phagen nach der Reinigung gegen PBS dialysiert und anschließend werden die Proteinkonzentration, die PFU, die Endotoxinkonzentration und die Antigenmenge bestimmt. Vorzugsweise werden die Endotoxinkonzentration und die Antigenmenge mit dem LAL-Test bzw. mit einem Immun-Dot-Blot bestimmt. Die Konzentration wird durch Verdünnung auf das gewünschte Maß eingestellt.
25

30 In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Verfahren unter GMP-Bedingungen durchgeführt, wobei GMP "good manufacturing practice" bedeutet und dem Fachmann bekannt und somit Stand der Technik ist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäß hergestellten hochmolekularen Verbindungen, wie Proteine oder proteinartige Verbindungen, vorzugsweise rekombinante filamentöse

5 Bakteriophagen, als biologisch bzw. pharmakologisch wirksame Bestandteile in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, beispielsweise einen Impfstoff, welche gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel umfaßt. Beispiele geeigneter Träger oder Verdünnungsmittel sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. Phosphat-gepufferte

10 Salzlösungen, Wasser, Emulsionen wie z.B. Öl/Wasseremulsionen, verschiedene Arten von Netzmitteln oder Detergenzien, sterile Lösungen, etc. Zusammensetzungen, die solche Träger und/oder Verdünnungsmittel umfassen, können mittels bekannten herkömmlichen Verfahren hergestellt werden.

15 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können einem Individuum in geeigneter Dosierung verabreicht werden. Eine Verabreichung kann oral oder parenteral erfolgen, z.B. auf intravenösem, intraperitonealem, subkutanem, perinodalem, intramuskulärem, topischem, intradermalen, intranasalem oder intrabronchialem Weg oder über einen Katheder in eine Arterie. Die Höhe der

20 Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt im wesentlichen von den klinischen Faktoren ab. Diese Faktoren sind im Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise die Körpergröße bzw. das Gewicht, die Körperoberfläche, das Alter, das Geschlecht und den allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten, die spezielle zu verabreichende

25 Zusammensetzung, die Behandlungsdauer, die Art der Verabreichung und die eventuelle gleichzeitige Behandlung mit einem anderen Arzneimittel. Eine typische Dosis kann z.B. in einem Bereich zwischen 0,001 und 5000 µg liegen, wobei Dosen unterhalb oder oberhalb dieses beispielhaften Bereiches, vor allem unter Berücksichtigung der oben erwähnten Faktoren, vorstellbar sind. Im allgemeinen

30 sollte sich bei regelmäßiger Verabreichung der erfindungsgemäß Zusammensetzung die Dosis in einem Bereich zwischen 1 µg- und 10 mg-Einheiten pro Tag befinden. Wird die Zusammensetzung intravenös verabreicht,

- 12 -

was nicht bevorzugt empfohlen wird, um die Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion zu minimieren, sollte sich die Dosis vorzugsweise in einem Bereich von etwa 1 µg bis etwa 10 mg Einheiten pro kg Körpergewicht pro Minute befinden.

- 5 Die pharmazeutische Zusammensetzung kann lokal oder systemisch verabreicht werden. Präparate für eine parenterale Verabreichung umfassen sterile wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Beispiele für nicht-wässrige Lösungsmittel sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle wie z.B. Olivenöl, und organische Esterverbindungen wie z.B. Ethyoleat, die für
- 10 Injektionen geeignet sind. Wässrige Träger umfassen Wasser, alkoholische wässrige Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Salzlösungen und gepufferte Medien. Parenterale Träger umfassen Natriumchlorid-Lösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Natriumchlorid, Ringer-Laktat und gebundene Öle. Intravenöse Träger umfassen z.B. Flüssigkeits-, Nährstoff-, und Elektrolyt-Ergänzungsmittel (wie z.B.
- 15 solche, die auf Ringer-Dextrose basieren). Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann außerdem Konservierungsmittel und andere Zusätze umfassen, wie z.B. antimikrobielle Verbindungen, Antioxidantien, Komplexbildner und inerte Gase. Des weiteren können, abhängig von der beabsichtigten Verwendung, Verbindungen wie z.B. Interleukine, Wachstumsfaktoren,
- 20 Differenzierungsfaktoren, Interferone, chemotaktische Proteine oder ein unspezifisches immunmodulatorisches Agens erhalten sein.

Die Figuren zeigen:

- 25 Fig. 1 zeigt eine graphische Darstellung der Wasch- und Elutionsschritte einer Ionenaustausch-Chromatographie. Das erste Signal enthält die Hauptfraktion von Endotoxinen und das zweite Signal enthält im wesentlichen die Phagen. Die gestrichelte Linie stellt den NaCl-Gradienten dar.
- 30 Fig. 2 ist eine photographische Abbildung eines Dot-BLOTS hinsichtlich der Aufreinigung von rekombinanten M13/fd-Phagen mit His-Tag/g8-Fusionsproteinen, wobei zur immunologischen Detektion monoklonale

- 13 -

Peroxidase-konjugierte/Anti-polyhistidin-Antikörper verwendet werden. Verdünnungsreihe von links nach rechts: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800; T=total; FT=Durchfluß; W1, W2, W3=jeweilige Waschschrifte; E1, E2, E3=jeweilige Elutionsschritte; WT-Wildtyp-Phage (vgl. Beispiel 4).

5

Fig. 3 ist eine photographische Abbildung eines Dot-Blots hinsichtlich der Aufreinigung von rekombinanten M13/fd-Phagen mit His-Tag/g8-Fusionsproteinen, wobei zur immunologischen Detektion monoklonale Peroxidasekonjugierte/Anti-polyhistidin-Antikörper verwendet werden. Verdünnungsreihe von links nach rechts: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800; T=total; FT=Durchfluß; W1, W2, W3=jeweilige Waschschrifte; E1, E2, E3=jeweilige Elutionsschritte; WT-Wildtyp-Phage (vgl. Beispiel 4). (A) Als Chromatographiematerial werden im Handel erhältlich Ni²⁺-Agarosebeads verwendet. (B) Als Chromatographiematerial wird eine erfindungsgemäße Cu²⁺-enthaltende Membran verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne Beschränkung des Schutzbereichs.

20

Beispiele

Beispiel 1: Cross-flow-Filtration von Bakteriophage M13-haltigen Lösungen bzw. Suspensionen.

25

2 L einer Bakteriophagen M13-Züchtung werden einer Cross-flow-Filtration unter Verwendung einer Hydrosart-Membran (Porengröße 0,4 µm) von Sartorius filtriert.

30

Die Ergebnisse zeigen, dass mit der einstufigen Methode der Cross-flow-Filtration ein Phagentiter von 8x10⁴ Phagen/L erhalten werden kann, was ungefähr dem Ergebnis einer Isolierung der Phagen unter Verwendung der im Stand der Technik bekannten zweistufigen Methode „Zentrifugation und PEG/NaCl-Präzipitation“

- 14 -

entspricht. Ferner können mit der Cross-flow-Filtration Kontaminationen mit Bakterienzellen im wesentlichen verhindert werden. Somit wird mit der Cross-flow-Filtration eine einfache und schnelle Methode zur Abtrennung von Phagen von Bakterienzellen bereitgestellt, die eine mindestens gleich gute Ausbeute wie die im Stand der Technik bekannte Methode „Zentrifugation und PEG/NaCl-Präzipitation“ liefert. Der Endotoxin-Gehalt der durch Cross-flow-Filtration erhaltenen Phagen entspricht ungefähr dem der Methode „Zentrifugation und PEG/NaCl-Präzipitation“.

5

10

Beispiel 2: Ionenaustausch-Chromatographie von Baktiophage M13-haltigen Lösungen bzw. Suspensionen.

15

20

25

30

2 mL einer 7 mg M13-Phagen enthaltenden Lösung, welche aus Beispiel 1 stammt, werden einer Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer von Sartorius erhältlichen Ionenaustausch-Membran Q75 bei 4°C unterzogen. Die Bindung der Phagen an die Membran erfolgt mit einem Bindungspuffer (PBS, pH7). Zur Elution der ebenfalls an die Membran gebundene Endotoxine wird die Membran mit einem Waschpuffer (PBS, 0,1% (v/v) Triton X-114, pH7) gewaschen. Die an die Membran gebundenen Phagen werden danach mit einem Elutionspuffer (PBS, kontinuierlicher Gradient: 150 mM bis 1 M NaCl, pH6) eluiert (vgl. auch Fig. 1). Die einzelnen Schritte der Ionenaustausch-Chromatographie werden durch Bestimmung der Phagen (mittels quantitativem ELISA) -und Endotoxin (mittels LAL-Test)-Konzentrationen analysiert.

Mit der Ionenaustausch-Chromatographie kann zwar eine Abreicherung der Endotoxine erhalten werden kann, aber eine vollständige Entfernung ist nicht möglich.

- 15 -

Beispiel 3: Beladen der mikroporösen Membran Sartobind®, IDA Typ 19442 aus regenerierter Cellulose, welche mit einem Vlies verstärkt wurde, mit Cu²⁺-Ionen (IDA=Imidodiessigsäure).

5 Die regenerierte Cellulose ist durch Einführung bifunktioneller chemischer Gruppen gegenüber enzymatischem und chemischem Abbau stabilisiert worden. Des weiteren wurden Polymethacrylatketten aufgepropft, wobei die einzelnen Monomere jeweils eine Epoxygruppierung enthalten. An diese wurden chemisch Iminodiessigsäuregruppen gekoppelt. Die Membran ist 275 +/- 27µm dick und
10 weist eine Durchflussrate von mehr als 80ml/min·bar auf, wenn schwach gepufferte wässrige Salzlösungen im pH-Bereich von 5 bis 9 verwendet werden. Die nominelle Porengröße liegt im Bereich von 3 bis 5 µm.
Die in einem Kunststoffgehäuse angeordnete Membran wird mit einer 50 mL Spritze ohne Kolben verbunden und nacheinander mit 3 mL deionisiertem
15 Wasser, 4 mL vorgefilterter 0,3 M CuCl₂-Lösung, 3 ml deionisiertem Wasser und 5 ml PBS behandelt bzw. gewaschen. Die so behandelte Membran ist nun gebrauchsfertig für eine Affinitätschromatographie.

Beispiel 4: Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Phagen unter Verwendung von einer Cu²⁺-enthaltender Membran.

20 2 mL einer M13/fd-Phagensuspension (in PBS), welche rekombinante Phagen mit His-Tag/g8-Fusionsproteinen auf der Oberfläche enthält, wird mit einer peristaltischen Pumpe bei einer Flußrate von 0,25 mL/min auf die gemäß Beispiel
25 3 erhaltene Cu²⁺-enthaltende Membran aufgebracht. Die Membran wird danach dreimal mit 5 mL PBS (W1, W2, W3) bei einer Flußrate von 0,5 mL/min gewaschen und anschließend werden die an die Membran gebunden rekombinanten Phagen nacheinander mit 2 mL 20 mM EDTA, 2 mL 40 mM EDTA und 20 mL 80 mM EDTA jeweils bei einer Flußrate von 0,25 mL/min eluiert (E1,
30 E2, E3). Die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde mit einem Dot-Blot unter Verwendung von monoklonalen Peroxidase-konjugierten/Anti-polyhistidin-Antikörpern analysiert.

- 16 -

Wie aus Fig. 2 deutlich ersichtlich ist, werden die rekombinanten Phagen spezifisch an die Cu²⁺-enthaltende Membran gebunden und mittels EDTA eluiert.

5 Die verwendete Membran kann durch ausreichendes Waschen mit 0,5 M EDTA zur Entfernung der Cu²⁺-Ionen, Waschen mit PBS/5 % SDS in umgekehrter Richtung und ausreichendes Waschen mit deionisiertem Wasser zur Entfernung von SDS wiederverwendet werden oder bei 4 °C in einem versiegelten Behältnis gelagert werden.

10

Vergleichsbeispiel 1: Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinanten Phagen unter Verwendung von Ni²⁺-Agarosebeads.

15 Im Handel erhältliche Ni²⁺-Agarosebeads (Fa. Amersham) werden gemäß dem Protokoll der Herstellerin mit den in Beispiel 4 beschriebenen rekombinanten Phagen beladen, über Nacht inkubiert und anschließend eluiert.

20 Als Ergebnis ist festzuhalten, daß die über Ni²⁺-Agarosebeads (siehe Dot-Blot in Fig. 3(A) erzielte Aufreinigung von rekombinanten Beaktriophagen mit den Ni²⁺-Agarosebeads deutlich schlechter ist als die in Fig. 3(B) dargestellte Aufreinigung mit der erfindungsgemäß verwendeten Cu²⁺-Membran.

Ansprüche

1. Verfahren zur Aufreinigung und/oder Isolierung von in einer Lösung oder
5 Suspension enthaltenen hochmolekularen Verbindungen mit der Fähigkeit
zur Metallchelat-Bildung, umfassend die Schritte:
 - (a) Aufbringen der Lösung oder Suspension auf eine Metallionen-
enthaltende Membran und
 - (b) affinitätschromatographische Abtrennung der hochmolekularen
10 Verbindungen durch deren Bindung an die Metallionen-enthaltende
Membran.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die hochmolekularen Verbindungen ein
Molekulargewicht von größer als 1×10^6 Da aufweisen.
15
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die hochmolekularen
Verbindungen aus der Gruppe, bestehend aus hochmolekularen Proteinen,
hochmolekularen proteinartigen Verbindungen, hochmolekularen
Biopolymeren, hochmolekularen Lipiden, Mizellen mit einem hohen
20 Molekulargewicht und Liposomen mit einem hohen Molekulargewicht,
ausgewählt sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Metallionen aus der
Gruppe, bestehend aus Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} und Ca^{2+} und
25 Gemischen davon, ausgewählt sind.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Metallion Cu^{2+} ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Membran ein
30 Matrixmaterial, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Agarosen,
modifizierten Agarosen, modifizierten Dextranen, Polystyrolen, Polyethern,
Polyacrylamiden, Polyamiden, Cellulose, modifizierten Cellulosen wie

- 18 -

vernetzten Cellulosen, Nitrocellulosen, Celluloseacetaten, Silikaten und Poly(meth)acrylaten, Polytetrafluorethylen, Polyester, Polyvinylchloriden, Polyvinylidenfluorid, Polypropylen, Polysulfonen und Polyethersulfonen .

5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Metallionen-
enthaltende Membran eine Porengröße im Bereich von 0,01 bis 12 µm,
bevorzugt von 0,45 bis 7 µm, besonders bevorzugt von 3 bis 5 µm aufweist.

10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei die hochmolekularen
proteinartigen Verbindungen aus der Gruppe, bestehend aus
(Poly)peptiden und Derivaten davon, derivatisierten Proteinen,
rekombinanten Proteinen und (Poly)peptiden, Di-, Tri-, Tetra-, bis
Multimeren von Peptiden, Polypeptiden oder Proteinen,
(Multi)proteinkomplexen, Zellorganellen, Fusionsproteinen, Viren oder
15 Teilen davon, rekombinanten Viren oder Teilen davon und rekombinanten
Bakteriophagen oder Teilen davon, ausgewählt sind.

20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin vor Schritt (a) ein die
hochmolekularen Verbindungen enthaltendes Gemisch einer
Ionenaustauschchromatographie zur Entfernung von Verunreinigungen
unterzogen wird.

25 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Ionenaustauschchromatographie
unter Verwendung einer Ionenaustauschmembran durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Ionenaustauschmembran ein
Matrixmaterial, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Agarosen,
modifizierten Agarosen, modifizierten Dextranen, Polystyrolen, Polyethern,
Polyacrylamiden, Polyamiden, Cellulose, modifizierten Cellulosen wie
30 vernetzten Cellulosen, Nitrocellulosen, Celluloseacetaten, Silikaten und
Poly(meth)acrylaten, Polytetrafluorethylen, Polyester, Polyvinylchloriden,
Polyvinylidenfluorid, Polypropylen, Polysulfonen und Polyethersulfonen
umfaßt.

- 19 -

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei die Ionenaustauschermembran eine Porengröße im Bereich von 0,01 bis 12 µm, bevorzugt von 0,45 bis 7 µm, besonders bevorzugt von 3 bis 5 µm aufweist.
5
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die funktionellen Gruppen der Ionenaustauschermembran aus der Gruppe, bestehend aus DEAE, DEA, CM, QA, TMA, S, SP und Phosphat-Gruppen, ausgewählt sind.
10
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei die Verunreinigungen bakterielle Endotoxine, Nährmediumbestandteile und Verunreinigungen von Nährmediumbestandteilen umfassen.
15
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin vor Schritt (a) und/oder vor der Ionenaustauschchromatographie gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14 ein die hochmolekularen Verbindungen enthaltendes Gemisch einer Filtration unter Verwendung einer Filtrationsmembran zur Entfernung von weiteren Verunreinigungen unterzogen wird.
20
16. Verwendung der gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 aufgereinigten und/oder isolierten hochmolekularen Verbindungen als biologisch wirksame Bestandteile in einer pharmazeutischen Zusammensetzung welche gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel enthält.
25

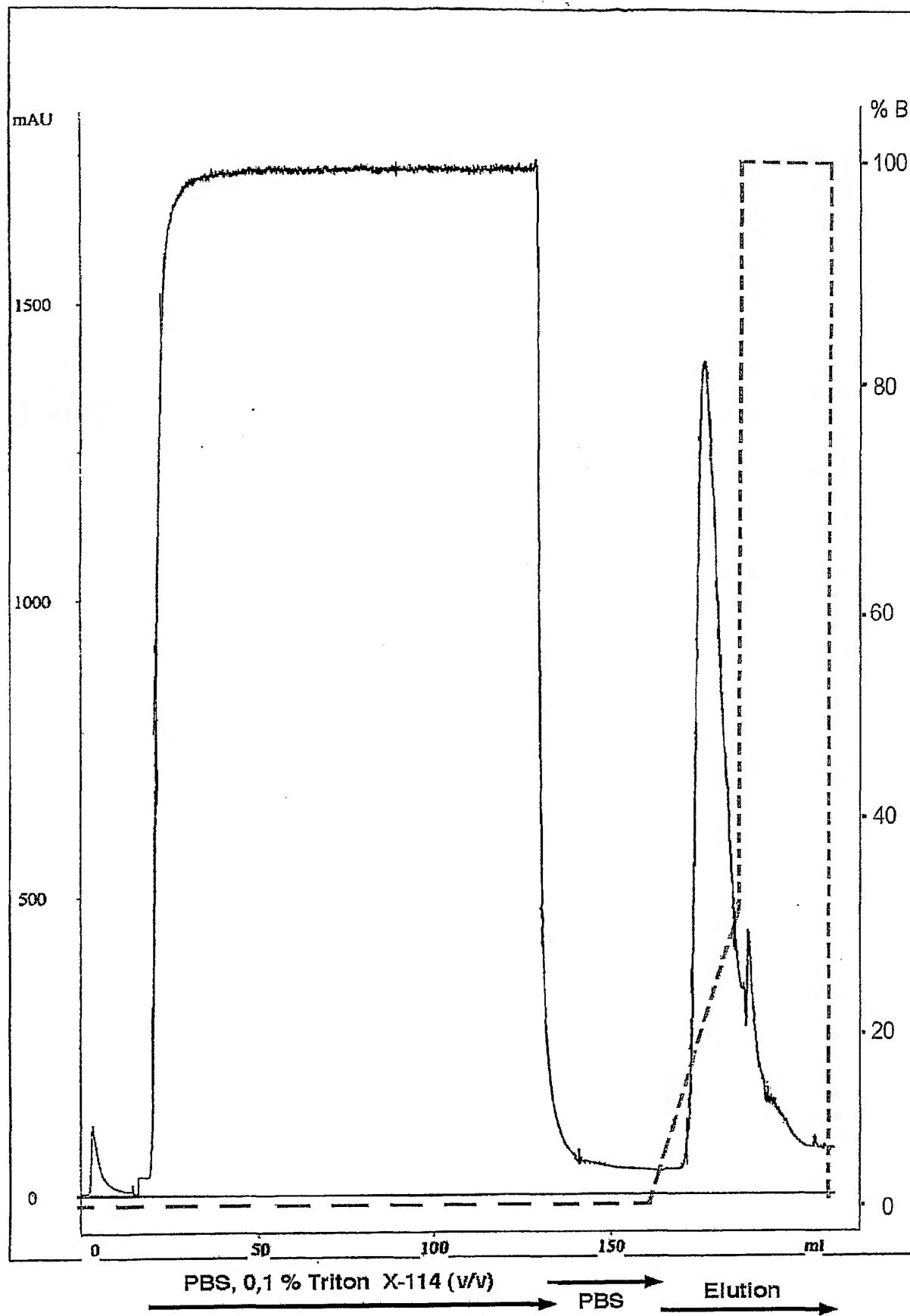


Fig. 1

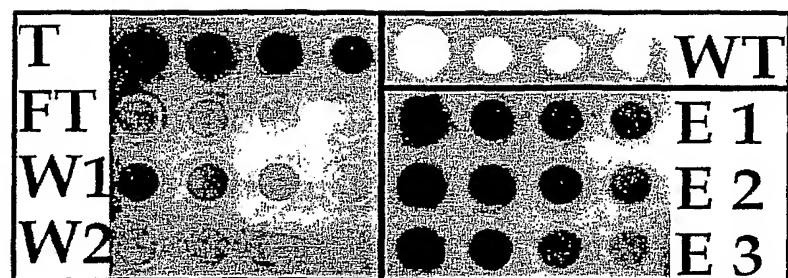


Fig. 2

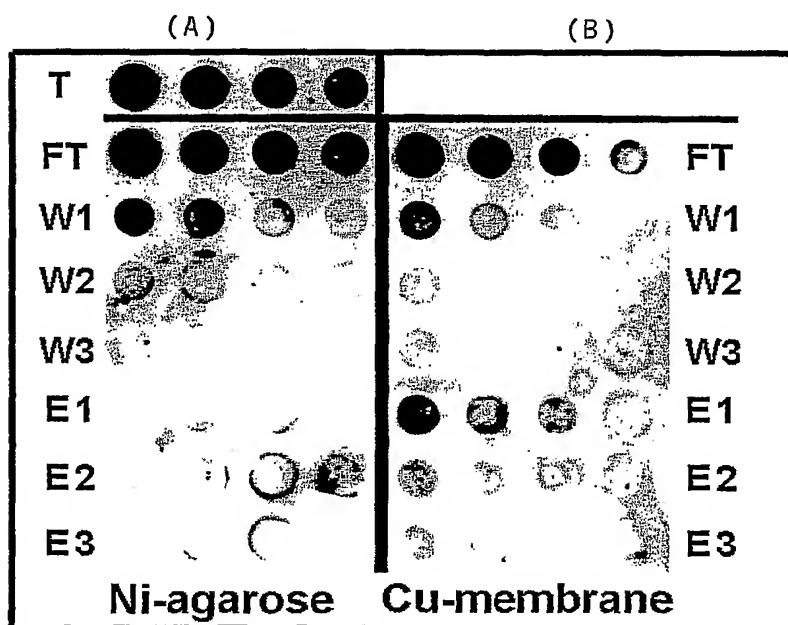


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/000810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K1/22 C07K14/005

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE., vol. 179, no. 1, 2000, pages 1-27, XP004237304 NL ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL.COMPANY. AMSTERDAM. the whole document -----	1
X	JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE., vol. 207, 2002, pages 253-264, XP004370641 NL ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL.COMPANY. AMSTERDAM. the whole document -----	1
X	JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 50, no. 2, May 2000 (2000-05), pages 110-113, XP002256823 US WILEY, NEW YORK, NY the whole document -----	1

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May 2005

Date of mailing of the international search report

06/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/000810

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LI, YANG ET AL: "Immobilized iminodiacetic acid (IDA)-type Cu²⁺-chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase" XP002327717 retrieved from STN Database accession no. 131:141208 abstract & BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY , 13(3), 229-234 CODEN: BICHE2; ISSN: 0269-3879, 1999, abstract</p> <p>-----</p>	1
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ZHOU, DONGMEI ET AL: "Fast assay and mini-preparation of protein by high performance membrane affinity chromatography" XP002327715 retrieved from STN Database accession no. 130:165027 abstract</p>	1
A	<p>& SHENGWU GONGCHENG XUEBAO , 14(4), 389-394 CODEN: SGXUED; ISSN: 1000-3061, 1998, abstract</p> <p>-----</p>	
X	<p>DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; YANG, LI ET AL: "Immobilized IDA-type Cu²⁺-chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase" XP002327716 retrieved from STN Database accession no. 127:146368 abstract & SEPU , 15(4), 292-295 CODEN: SEPUER; ISSN: 1000-8713, 1997, abstract</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/000810

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K1/22 C07K14/005

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBiete

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE., Bd. 179, Nr. 1, 2000, Seiten 1-27, XP004237304 NL ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL.COMPANY. AMSTERDAM. das ganze Dokument	1
X	JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE., Bd. 207, 2002, Seiten 253-264, XP004370641 NL ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL.COMPANY. AMSTERDAM. das ganze Dokument	1
X	JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, Bd. 50, Nr. 2, Mai 2000 (2000-05), Seiten 110-113, XP002256823 US WILEY, NEW YORK, NY das ganze Dokument	1
-/-		

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10. Mai 2005	06/06/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Masturzo, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP2005/000810

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; LI, YANG ET AL: "Immobilized iminodiacetic acid (IDA)-type Cu ²⁺ -chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase" XP002327717 gefunden im STN Database accession no. 131:141208 Zusammenfassung & BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY , 13(3), 229-234 CODEN: BICHE2; ISSN: 0269-3879, 1999, Zusammenfassung -----	1
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; ZHOU, DONGMEI ET AL: "Fast assay and mini-preparation of protein by high performance membrane affinity chromatography" XP002327715 gefunden im STN Database accession no. 130:165027 Zusammenfassung & SHENGWU GONGCHENG XUEBAO , 14(4), 389-394 CODEN: SGXUED; ISSN: 1000-3061, 1998, Zusammenfassung -----	1
A	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; YANG, LI ET AL: "Immobilized IDA-type Cu ²⁺ -chelating membrane affinity chromatography for purification of bovine liver catalase" XP002327716 gefunden im STN Database accession no. 127:146368 Zusammenfassung & SEPU , 15(4), 292-295 CODEN: SEPUER; ISSN: 1000-8713, 1997, Zusammenfassung -----	1
X		